

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. A. Kröncke

ÜBER DEN ADENOSINTRIPHOSPHAT- GEHALT DER PLAQUE: BESTIMMUNG MIT DER LUCIFERIN- LUCIFERASE BIOLUMINESZENZ REAKTION

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Gerald Maurer
aus Fürth



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546216_0049

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. A. Kröncke

ÜBER DEN ADENOSINTRIPHOSPHAT- GEHALT DER PLAQUE: BESTIMMUNG MIT DER LUCIFERIN- LUCIFERASE BIOLUMINESZENZ REAKTION

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Gerald Maurer
aus Fürth

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. A. Kröncke

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.1981

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. <u>Einleitung und Problemstellung</u>	1
B. <u>Schrifttumsübersicht</u>	4
1. Struktur, Verbreitung und physiologische Bedeutung des Adenosintriphosphates	4
2. ATP-Bestimmung mit der Luciferin-Luciferase Biolumineszenz Reaktion	5
C. <u>Material und Methode</u>	11
1. Probanden	11
2. Gewinnung und Aufbereitung der Plaques	13
3. ATP-Bestimmung	14
4. Vitalfärbung und Fluoreszenzmikroskopie	16
D. <u>Ergebnisse</u>	18
1. Beziehung zwischen Lichtintensität und ATP-Konzentration	18
2. ATP-Gehalt der Plaque nach Ultraschallbehandlung	19
3. Stabilität von ATP in der Plaque	20
4. ATP-Gehalt der Plaque	21
5. ATP-Gehalt der Plaque als Funktion des Plaquealters	24
6. Fluoreszenzmikroskopie	25
E. <u>Diskussion</u>	29
F. <u>Zusammenfassung</u>	35
G. <u>Schrifttum</u>	36

A. Einleitung und Problemstellung

Das zentrale Interesse der Zahnmedizin in der Erforschung der Zahnplaques ergibt sich aus deren überragender Bedeutung als ätiologischer Faktor der Karies und der entzündlichen marginalen Parodontopathien (VON DER FEHR et al. 1970; LÖE et al. 1965). Bei den Plaques handelt es sich um festhaftende, histologisch strukturierte Beläge aus lebenden und toten Mikroorganismen, die in einer polysaccharid- und glykoproteinreichen Matrix eingebettet sind (RIETHE 1969).

Da die Plaque ihre kariogene Wirkung erst im Zusammenspiel mit den Nahrungskohlehydraten erhält (HOPPERT et al. 1931; SOGNAES 1950; KITE et al. 1950), stehen die mikrobiellen Stoffwechseleleistungen in der Plaque im Mittelpunkt der Kariesforschung. Neben den unmittelbar zur Kariesläsion führenden Reaktionen, in deren Verlauf die aus dem mikrobiellen Zuckerabbau resultierenden organischen Säuren die Entmineralisierung des Schmelzes bewirken, sind die Synthese und Speicherung von intra- und extrazellulären Polysacchariden entscheidende kariesätiologische Faktoren (GIBBONS 1968). Die intrazellulären Reservekohlehydrate befähigen die Plaqueflora auch in Zeiten, in denen kein Nahrungszucker angeboten wird, zur Säureproduktion, wodurch sich die Schmelzoberfläche einem anhaltenden Säureangriff gegenüber sieht. Die Bedeutung der extrazellulären Polysaccharide für die Entstehung eines kariösen Defektes liegt in der Förderung des Plaquewachstums durch Bildung einer organischen Matrix, die die Bakterien untereinander und mit der Zahnoberfläche verbindet.

Zahlreiche Autoren (O'LEARY et al. 1962; ASH et al. 1964; GÜLZOW 1965; THEILADE et al. 1966) zeigten eine direkte Wechselbeziehung zwischen der Plaquemenge und dem Ausmaß und der Intensität der entzündlichen Veränderungen des marginalen Parodonts auf, ohne allerdings den genauen Wirkungsmechanismus zu kennen, der zur Entzündung und Zerstörung des gingivalen Gewebes führt.

Nach heutigen Kenntnissen wird es als erwiesen angesehen, daß die Plaquebakterien nicht in das Gingivagewebe eindringen, sondern die Wechselwirkungen zwischen den Stoffwechselprodukten der Plaqueflora und dem Gewebe für die Entzündung und Zerstörung des Parodontiums verantwortlich sind (RENGGLI 1975). Als schädigende Stoffe gelten bakterielle Enzyme (Kollagenase, Hyaluronidase), die die Interzellularsubstanz von Epithel oder Bindegewebe zerstören und zytotoxische Substanzen (Endotoxin, Ammoniak), die den Zelltod herbeiführen. Obwohl die Fähigkeit dieser Metaboliten, parodontales Gewebe zu zerstören, experimentell gesichert ist (AISENBERG und AISENBERG 1951; SCHULTZ-HAUDT et al. 1954; COBB und BROWN 1967; MURPHY und STALLARD 1968), gibt es keine eindeutigen Beweise für ihre tatsächliche Beteiligung an den pathologischen Prozessen (SOCRANSKY 1970). Zusätzlich werden als Ursache für die destruktiven Veränderungen des Parodonts auch überschießende immunologische Reaktionen diskutiert, die durch eindringende Plaquesubstanzen mit Antigencharakter ausgelöst werden (MERGENHAGEN et al. 1970; SNYDERMAN 1973).

Zur Charakterisierung und quantitativen Erfassung der biochemischen Stoffwechselleistungen der Plaque ist eine standardisierte Bezugsgröße für die Menge des untersuchten Materials erforderlich. In früheren Untersuchungen wurden das Naßgewicht, das Trockengewicht, der Gesamtstickstoffgehalt (LANG 1958), der Proteingehalt (ROBINSON und HOGDEN 1940) oder der Anteil aller nichtflüchtiger organischer Bestandteile (JOHNSON 1949) als Kenngrößen gewählt. Sowohl die Bestimmung des Trockengewichts als auch die mikrochemischen Analyseverfahren sind aber mit beträchtlichen Verlusten an Untersuchungsmaterial verbunden, was bei den meist nur geringen Plaquemengen, die zur Verfügung stehen, von großem Nachteil ist. Obgleich AHRENS et al. (1964) das Naßgewicht wahllos entnommener Zahnbeläge als brauchbare Bezugseinheit ansahen, können Naßgewichtsbestimmungen, besonders bei minimalen Plaquemengen, durch Speichelverunreinigung oder durch Austrocknung der Proben mit beträchtlichen systematischen Fehlern versehen sein. Alle aufgeführten Kenngrößen ergeben keinen Auf-

schluß über die Anzahl lebender, stoffwechselaktiver Zellen.

Aus der universellen Verbreitung des Adenosintriphosphates (ATP) in allen lebenden Zellen (HUENNEKENS und WHITELY 1960) und dem raschen Abbau in abgestorbenen Zellen ergibt sich die Möglichkeit, den ATP-Gehalt der Plaques als Bezugsgröße für die lebensfähige Zellmenge heranzuziehen.

Zur quantitativen Erfassung des ATPs sind in der Literatur eine Anzahl von Methoden dargestellt. Außer der Bestimmung mit Hilfe von Ionenaustausch- und Papierchromatographie (COHN und CARTER 1950; HURLBERT et al. 1954) gibt es eine Reihe ATP-umsetzender, enzymatischer Reaktionen, wie zum Beispiel die Phosphoglyceratkinase- oder Hexokinasereaktion (BERGMEYER 1970), die zur Messung genützt werden. Die 1952 von STREHLER und TOTTER erstmalig beschriebene ATP-Bestimmung mit dem Luciferin-Luciferase System des Glühwürmchens zeichnet sich durch besonders hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit aus.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Eignung des ATP-Gehaltes als Bezugsgröße für die Menge an menschlicher Zahnplaque geprüft, wobei mit der Luciferase-Technik der Zusammenhang zwischen extrahierbarem ATP und dem Plaque Naßgewicht untersucht wird. Zur Bestimmung der Relativzahlen von lebenden und toten Bakterien werden die Plaqueproben gleichzeitig mit dem Vitalfarbstoff Acridinorange gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Aus den experimentell gefundenen Mittelwerten für den ATP-Gehalt der Plaques und den prozentualen Anteil der lebenden Mikroorganismen werden weiterhin die Lebendzellzahl und die Gesamtzellzahl errechnet.

B. Schrifttumsübersicht

1. Struktur, Verbreitung und physiologische Bedeutung des Adenosintriphosphates

Adenosintriphosphat (ATP) wurde 1929 erstmalig von FISKE und SUBBAROW aus Muskeln extrahiert und in seiner Struktur aufgeklärt. ATP ist ein Nucleotid, das aus der Purinbase Adenin, dem C₅-Zucker Ribose und drei Phosphatgruppen zusammengesetzt ist und beim pH-Wert von 7,0 der lebenden Zelle mit vier negativen Ladungen vorliegt.

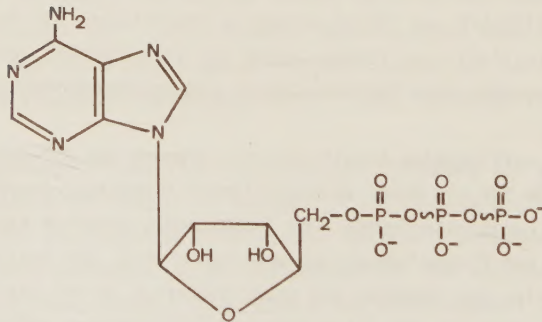


Abb. 1: Adenosintriphosphat (umgezeichnet nach LEHNINGER 1974):
Symbol ⚡ kennzeichnet die energiereiche Bindung.

Adenosintriphosphat ist Bestandteil aller tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Zellen in Konzentrationen zwischen 0,001 und 0,01 Mol/Liter Zellsaft (LEHNINGER 1974).

1941 postulierte LIPMANN die zentrale Bedeutung des Adenosintriphosphates als energiereiche Verbindung, wobei er im ATP das gemeinsame Zwischenprodukt sah, durch das energieliefernde und energieverbrauchende Reaktionen im Organismus verbunden werden.

Die beim aeroben und anaeroben Nährstoffabbau freiwerdende Oxidationsenergie wird nicht vollständig als Wärme freigesetzt, sondern zum Teil für die gekoppelte Phosphorylierung von ATP aus Adenosindiphosphat und anorganischem Phosphat abgefangen und auf diese Weise als chemische Energie gespeichert (BELLITSER und TSYBAKOVA 1939; WARBURG und CHRISTIAN 1939). Das ATP besitzt zwei energiereiche Phosphatbindungen, bei deren Spaltung Energie auf zahlreiche energieverbrauchende Prozesse der Zelle, wie Muskelkontraktionen (ENGELHARDT und LOUBIMOVA 1939) oder Biosynthesen (LIPMANN 1950), übertragen wird. So fanden BAUCHOP und ELSDEN (1960) bei verschiedenen Mikroorganismen eine Zellsyntheserate von ungefähr 10,5 g pro Mol ATP, und LEHNINGER (1974) errechnete für das Bakterium *Escherichia coli* einen Abbau von mindestens $2,5 \cdot 10^6$ Molekülen ATP/Zelle in der Sekunde, durch den die notwendige Energie für die Biosynthese der Zellbestandteile geliefert wird.

2. ATP-Bestimmung mit der Luciferin-Luciferase Biolumineszenz Reaktion

GUÉBUIR extrahierte 1887 bei seinen Forschungen über die lumineszierende Venusmuschel eine hitzestabile Verbindung, das Luciferin und ein hitzelabiles Enzym, das er als Luciferase bezeichnete. Das Luciferin-Luciferase System, das auch in einigen anderen Tier- und Pflanzenarten vorkommt, wurde von HARKVEY (1940) an Enzym-Substrat-Präparaten einer lumineszierenden Krebsart untersucht. Er beobachtete bei Anwesenheit von Luciferase und Sauerstoff eine irreversible Oxidation des Luciferins, die von einer Lichtproduktion begleitet wird.

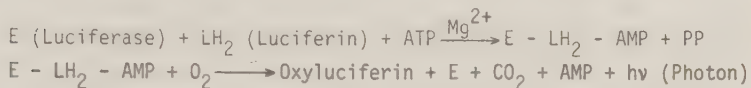
Die in den folgenden Jahren geäußerte Vermutung einer Beteiligung von Phosphatgruppen an der Lumineszenzreaktion (MC ELROY und BALLENTINE 1944) wurde 1947 durch MC ELROY's überraschende Entdeckung erhärtet, daß wäßrige Extrakte aus Glühwürmchenleuchtorganen nach Abklingen der Lichtemission durch Zusatz von ATP wieder zum Leuchten angeregt werden können. MC ELROY erhielt dabei eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration des zugefügten ATPs und der Dauer der Lichtemission.

MC ELROY und STREHLER (1949) untersuchten die Einflüsse verschiedener Faktoren auf die Biolumineszenzreaktion und berichteten zum erstenmal von einer teilweisen Reinigung und Fraktionierung des Glühwürmchenextraktes mit Ammoniumsulfat. Sie stellten fest, daß das pH-Optimum der Lumineszenzreaktion bei pH 7,75, das Temperatur-optimum bei 25° C liegt und neben Luciferase, Luciferin, Sauerstoff und ATP auch ein zweiwertiges Kation, am besten Magnesium- oder Manganionen, für die Lichtemission notwendig ist. Sie kamen über einen weiten Bereich zu einer linearen Beziehung zwischen der Lichtintensität und der ATP-Konzentration.

Im Jahr 1952 zeigten STREHLER und TOTTER die Möglichkeit auf, mit Hilfe des Luciferin-Luciferase Systems ATP in biologischem Material quantitativ zu erfassen. Mit einem Quantenzähler zur Messung der bei der Biolumineszenzreaktion emittierten Photonen gelang es ihnen, bei einer Genauigkeit von 5 % ATP-Mengen bis zu einer Konzentration von 1 Nanogramm/ml zu bestimmen. Darüber hinaus erkannten sie die Anwendungsmöglichkeit dieser Technik auf alle Substrate und Enzyme, die an ATP-umsetzenden Reaktionen beteiligt sind.

Innerhalb von zwei Jahren wurden das Enzym Luciferase (GREEN und MC ELROY 1956) und das Substrat Luciferin (BITLER und MC ELROY 1957) aus Glühwürmchenextrakten in kristalliner Form isoliert, ehe WHITE et al. (1961) die chemische Synthese des Luciferins gelang.

MC ELROY (1961) und SELIGER (1965) klärten den Mechanismus der Lumineszenzreaktion, bei der für jedes oxidierte Luciferinmolekül ein Photon emittiert wird (SELIGER und MC ELROY 1960):



Die Reaktionsfolge beginnt mit der Aktivierung des reduzierten Luciferins auf Kosten von ATP, an die sich der oxidative Schritt anschließt, in dessen Verlauf ein Teil der freigesetzten Energie als Licht erscheint.

Nachdem die Luciferin-Luciferase Reaktion in ihren Grundzügen erforscht war, unternahmen zahlreiche Autoren Anstrengungen, durch Modifikation der Methoden und Instrumente die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit des Verfahrens zu erhöhen.

Die Bestimmung von ATP in biologischem Material setzt seine vollständige Extraktion aus den Zellen voraus. Da die Umsatzzeit des ATPs in mikrobiellen Zellen etwa 1 - 2 Sekunden beträgt (LEHNINGER 1974; HARRISON und MAITRA 1968), muß jede Extraktion das ATP so schnell freisetzen, daß die zelleigenen Enzyme den ATP-Spiegel nicht mehr verändern können. So fanden solche unterschiedlichen Extraktionsmittel wie Mineralsäuren, Basen, heiße Puffer oder organische Lösungsmittel Eingang in die ATP-Versuche. In ihrer vergleichenden Untersuchung betonten DHOPLÉ und HANKS (1973) den geringen Wert vieler Zahlenangaben über den ATP-Gehalt von Mikroben, da durch die verschiedenen Extraktionsmethoden entweder nicht alles ATP freigesetzt wird, hydrolytische Prozesse im Extrakt nicht verhindert werden oder die Luciferasereaktion unterdrückt wird (CHAPMAN et al. 1971).

Als begrenzender Faktor für die Erfassung von ATP-Mengen im Pico-grammbereich wurde von mehreren Forschern die Anwesenheit von Rest-

ATP im Glühwürmchenrohextrakt erkannt (LYMAN und DE VINCENZO 1967; NIELSEN und RASMUSSEN 1968; ROBERTON und WOLFE 1970; CORTENBOSCH und SCHRAM 1971; WETTERMARK et al. 1975; CONN et al. 1975). Dieser endogene ATP-Wert konnte durch Altern des Präparates (STANLEY und WILLIAMS 1969; CONN et al. 1975), durch Inkubation mit einem ATP-hydrolysierenden Enzym (LYMAN und DE VINCENZO 1967; WETTERMARK et al. 1975) oder durch Gelfiltration (NIELSEN und RASMUSSEN 1968; LUNDIN et al. 1976) auf einen geringen und konstanten Betrag reduziert werden. Durch die Gelfiltration des Rohextraktes werden größtenteils auch die Enzyme Adenylatkinase und Nucleosiddiphosphatkinase abgetrennt, die die Bildung von ATP aus anderen Nucleotiden katalysieren (NIELSEN und RASMUSSEN 1968; RASMUSSEN und NIELSEN 1968; HAMMERSTEDT 1973) und dadurch einen Mangel an Spezifität bedingen.

Frühere Versuche zur Messung der Lumineszenz bei der Luciferin-Luciferase Reaktion wurden mit Fluorimetern (STREHLER und TOTTER 1952; BEUTLER und BALUDA 1964) und Photometern (LYMAN und DE VINCENZO 1967; ST. JOHN 1970) durchgeführt. Der von TAL et al. (1964) erstmals zur Erfassung der Lichtintensität benützte Flüssigkeits-Szintillationszähler fand in den folgenden Jahren bei weiteren Untersuchungen Verwendung (ADDANKI et al. 1966; COLE et al. 1967; STANLEY und WILLIAMS 1969; CHEER et al. 1974; KIMMICH et al. 1975).

Obwohl fast alle Autoren darin übereinstimmen, daß die Lumineszenz des Luciferin-Luciferase Systems nach Zugabe von ATP schnell absinkt (MC ELROY und STREHLER 1949; STREHLER und TOTTER 1952; ADDANKI et al. 1966; STANLEY und WILLIAMS 1969), findet man in der Literatur widersprüchliche Angaben über den günstigsten Zeitpunkt für die quantitative Erfassung des emittierten Lichtes nach Mischen von Enzym und zu analysierender Probe. Während einige Untersucher (LYMAN und DE VINCENZO 1967; RASMUSSEN und NIELSEN 1968; KLOFAT et al. 1969) das initiale Lichtmaximum für den zuverlässigsten Wert zur ATP-Messung ansahen und LYMAN (1967) schon nach 15 Sekunden, bedingt durch

Produkthemmung und enzymatische Hydrolyse des ATPs (RASMUSSEN und NIELSEN 1968), keine Lumineszenz mehr nachweisen konnte, hielt der überwiegende Teil der Autoren (HOLMS et al. 1972; HOLM-HANSEN und PAERL 1972; HAMMERSTEDT 1973; CHEER et al. 1974; WETTERMARK et al. 1975; KARL und HOLM-HANSEN 1976) die Messung über einen definierten Zeitraum, beginnend einige Sekunden nach dem Mischen, für proportional zu der in der Probe enthaltenen ATP-Menge. ST. JOHN (1970) vereinigte beide Verfahren, indem er vom Zeitpunkt des Mischens an für 30 Sekunden das emittierte Licht zählte und damit sowohl das anfängliche Lichtmaximum als auch einen Teil des folgenden Lichtabfalles aufzeichnete und zur ATP-Bestimmung heranzog.

Mehrere Forscher haben den ATP-Pool einer Vielzahl von Mikroorganismen, die unter den verschiedensten Kulturbedingungen wuchsen, mit Hilfe der Luciferin-Luciferase Technik gemessen (SCHÖN 1969; WELSCH und SMITH 1969; OELZE und KAMEN 1971; OLEINIKOV et al. 1971; JANTZEN 1974; GADKARI und STOLP 1975; PETROVA et al. 1976; MATHIS und BROWN 1976). FORREST (1965) beobachtete bei seinen Experimenten mit *Streptococcus faecalis* während des Wachstums weite Schwankungen des ATP-Spiegels, die allerdings die Wachstumsgeschwindigkeit in keiner Weise beeinflussten. Es zeigte sich aber, daß der ATP-Gehalt über einem kritischen Wert liegen muß, um die erforderliche Energie für die Syntheseleistungen während des exponentiellen Wachstums zu liefern. Untersuchungen mit *Escherichia coli* (COLE et al. 1967) ergaben unterschiedliche ATP-Werte für die verschiedenen Kulturbedingungen und Nährböden. Da die meisten ATP-Bestimmungen in Bakterienreinkulturen durchgeführt worden waren, ließen KAO et al. (1973) *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* in einer gemischten Kultur wachsen und stellten, verglichen mit den beiden Bakterienreinkulturen, geringere ATP-Mengen fest, wobei sie den Mechanismus, der dieser Beobachtung zugrunde lag, nicht erklären konnten.

D'EUSTACHIO und LEVIN (1967) maßen den ATP-Spiegel einiger aerober

Bakterien und fanden ihn durch alle Wachstumsphasen hindurch relativ konstant. Bei ihren auf weitere Bakterienarten ausgedehnten Forschungen erhielten D'EUSTACHIO und JOHNSON (1968) ATP-Werte im Bereich von $2,2 - 10,3 \cdot 10^{-10}$ $\mu\text{g ATP/Zelle}$. Sie beschrieben eine lineare Korrelation zwischen dem gemessenen ATP-Gehalt einer Bakterienprobe und der Zellzahl, die mit herkömmlichen Plattengußverfahren ermittelt wurde. Gleichzeitig diskutierten sie die Möglichkeit, mit Hilfe des errechneten Mittelwertes von $4,7 \cdot 10^{-10}$ $\mu\text{g ATP/Zelle}$ die Bakterienpopulationen diverser biologischer Systeme zu bestimmen (D'EUSTACHIO und JOHNSON 1968; D'EUSTACHIO et al. 1968). CHAPPELLE und LEVIN (1968) benützten dann als erste den Lumineszenz-Versuch zur Erfassung der mikrobiellen Biomasse. Als Ausweitung dieses Versuches wurde in späteren Jahren die Lebendzellzahl in so unterschiedlichen Systemen wie Meereswasser (HOLM-HANSEN und BOOTH 1966; HOLM-HANSEN 1969), Abwässerschlämme (PATTERSON et al. 1970), Nahrungsmittel (SHARPE et al. 1970) und Seesedimenten (LEE et al. 1971) gemessen.

ROBRISH, KEMP und BOWEN (1978) benützten die ATP-Messung zur Bestimmung der Lebendbakterienzahl in Plaqueproben von Rhesusaffen, wobei sie durch die quantitative Erfassung des Proteingehaltes zusätzlich die Gesamtzellmenge ermittelten.

C. Material und Methode

1. Probanden

Sämtliche Untersuchungen wurden an der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkranke der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt. Die Plaqueproben stammten von 40 männlichen und weiblichen Patienten im Alter zwischen 11 und 62 Jahren.

28 Probanden, deren Plaques sowohl auf den ATP-Gehalt als auch auf die relativen Anteile von lebenden und toten Mikroorganismen untersucht wurden, waren vor der Plaqueentnahme nach ihren Ernährungsgewohnheiten sowie eventuellen Allgemeinkrankheiten befragt worden. Die Aussagen über die Ernährungsbedingungen ermöglichten aber nur einen unzureichenden Einblick in die tatsächlichen Gewohnheiten des einzelnen, so daß dieses Merkmal nicht weiter berücksichtigt werden konnte. Zusätzlich wurde von jedem der 28 Patienten ein intraoraler Befund erstellt, in dem Füllungen, kariöse Defekte, Zahnersatz und Gingivitiden vermerkt wurden.

Tabelle 1: Angaben zu den 28 befragten und untersuchten Probanden.

Prob.Nr.	Name	Geschl.	Alter	KA-Index	Ging.	All.Kr.	Z.Ers.
1	E.B.	w	41	3	+	a	-
2	F.S.	m	18	3	+	-	-
3	W.F.	m	37	4	+	-	-
4	M.S.	m	18	3	+	-	-
5	M.G.	m	28	2	+	-	-
6	J.W.	m	49	4	+	a	b
7	B.M.	m	21	3	-	-	-
8	R.N.	w	50	2	+	a	c
9	W.R.	m	36	3	+	a	-

Tabelle 1 (Fortsetzung):

Prob.Nr.	Name	Geschl.	Alter	KA-Index	Ging.	All.Kr.	Z.Ers.
10	B.M.	w	40	4	+	-	b
11	U.K.	m	23	2	-	-	-
12	R.P.	m	17	3	-	-	-
13	J.S.	m	19	3	+	-	-
14	R.M.	m	17	2	+	-	-
15	H.B.	m	39	3	+	a	-
16	H.M.	w	42	4	+	-	c
17	G.M.	m	23	3	-	-	-
18	J.R.	w	21	3	+	-	-
19	A.D.	m	27	3	+	-	-
20	U.H.	w	21	3	+	-	-
21	F.F.	m	27	3	+	-	-
22	H.F.	m	42	3	-	-	-
23	U.M.	w	46	3	-	a	b
24	F.B.	m	39	3	+	-	-
25	D.S.	m	44	1	+	-	-
26	A.K.	m	11	2	-	-	-
27	O.W.	m	33	2	-	a	b,c
28	M.D.	m	18	3	+	-	-

Prob.Nr. = Probanden Nummer

Geschl. = Geschlecht: m = männlich, w = weiblich

Alter = angegeben in Jahren

KA-Index = Kariesanfälligkeits-Index nach TURNER und MEYER (1952):

1 = geringe Kariesanfälligkeit (nur BLACK I-Kavitäten)

2 = mittlere Kariesanfälligkeit (BLACK II-Kavitäten)

3 = hohe Kariesanfälligkeit (BLACK III/IV-Kavitäten an den oberen Frontzähnen)

4 = extrem hohe Kariesanfälligkeit (BLACK III/IV-Kavitäten

an den unteren Frontzähnen)

Ging. = Gingivitis

All.Kr. = Allgemeinkrankheit: a = Kreislaufstörungen

Z.Ers. = Zahnersatz: b = Kronen, c = Brücken

Bei der relativ geringen Probandenzahl konnte allerdings keine Beeinflussung des ATP-Gehaltes (Tabelle 2) oder des Anteils an lebenden Plaquebakterien (Tabelle 3) durch eine dieser Größen festgestellt werden.

2. Gewinnung und Aufbereitung der Plaques

Um eine Verunreinigung mit Speichel, Materia alba oder Nahrungsresten zu vermeiden, wurden die Plaques vor ihrer Entnahme mit dem Wasserspray gespült und mit dem Luftbläser getrocknet (RANKE et al. 1967). Je nach vorhandener Menge wurden die Plaques entweder von einzelnen Zähnen, von Zahngruppen oder aus dem gesamten Gebiß gewonnen, überwiegend jedoch von den Bukkalflächen der Zähne. Zum Schutz vor Flüssigkeitsverlusten (LOESCHE und GREEN 1972; TRAPP et al. 1975) wurden die Plaques nach ihrer Abnahme mit einem sterilen Heidemann-Spatel sofort in ein gewogenes Gläschen mit Schliffdeckel eingebracht.

Die Naßgewichte der Plaques wurden in allen Fällen innerhalb von 5 Minuten nach Entnahme mit einer Mikrowaage (Sartorius, Göttingen) bestimmt; sie lagen meist zwischen 20 und 50 mg, bei einem kieferbruchgeschienten Patienten konnten sogar 84 mg Plaques gesammelt werden. Anschließend wurde jeweils ein adäquater Teil der Plaques in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung (Pfrimmer, Erlangen) suspendiert und 2 x 10 Sekunden bei niedrigster Leistung mit Ultraschall homogenisiert (Sonic 300 S mit Nadelschwingsonde 4 mm Durchmesser, Braun, Melsungen). Zur ATP-Messung wurden die vorbehandelten Plaqueproben im Verhältnis 1:100 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. Lediglich bei einer Untersuchung, in der gerade 4,59 mg Plaques zur

Verfügung standen, wurde eine 1:25 Verdünnung gewählt. Daraus ergaben sich für die Plaquesuspensionen Konzentrationen zwischen 3,43 µg und 9,18 µg Plaques pro 50 µl physiologischer Kochsalzlösung.

Zur Bestimmung des ATP-Gehaltes in Abhängigkeit vom Alter der Plaque stellten sich 4 Testpersonen zur Verfügung. Nach mehrmaligem Zähneputzen und Kontrolle auf eventuell noch vorhandene Plaques mit Erythrosin-Färbetabletten (Blendax, Mainz) stellten die Probanden für 5 Tage jegliche Mundhygiene ein, hielten aber an ihrer normalen Ernährung fest. In diesem Zeitraum wurde nach 12, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden Plaque entnommen und wie oben angegeben aufbereitet. Wegen der, besonders in den ersten Tagen, geringen Plaquemengen wurde allerdings nur im Verhältnis 1:10 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt.

3. ATP-Bestimmung

ATP wurde mit einem Photometer (Celltester M 1030, Lumac Systems, Basel) und einem Biolumineszenz-Reagenziensatz (Lumac Systems, Basel) durch die Luciferin-Luciferase Reaktion (STREHLER und TOTTER 1952) gemessen. Der Reagenziensatz beinhaltet Lumit[®]-high sensitivity, Hepes-Puffer (pH 7,75) und NRB[®]-Reagenz. Beim Lumit[®] handelt es sich um ein gereinigtes und stabilisiertes, kristallines Luciferin-Luciferase-Präparat, das einen geringen Leerwert und eine hohe Spezifität besitzt. Hepes-Puffer (2 - [4 - (2 - Hydroxyäthyl) - piperazinyl - (1)] - äthansulfonsäure) enthält zusätzlich Magnesiumionen, eine Substanz zur Hemmung des bakteriellen Wachstums und einen Komplexbildner, der Störreaktionen anderer Metallionen verhindert (LUMAC APPLICATION BULLETIN 1977). Das NRB[®]-Reagenz, das ATP ohne Zellauflösung aus allen mikrobiischen Zellen freisetzt, wurde von RIEDL (1981) als wirkungsvollstes ATP-Extraktionsmittel in Plaque beschrieben.

Zur Herstellung der fertigen Luciferin-Luciferase Lösung wurde der

Inhalt eines Lumit[®]-Fläschchens in 5 ml Hepes-Puffer gelöst und vorsichtig vermischt. Sofern sie über Nacht im Kühlschrank (4° C) aufbewahrt wurde, behielt die angesetzte Lösung auch noch am folgenden Tag ihre volle Aktivität. Während der Versuchsdauer wurden alle Reagenzien zur Vermeidung von Aktivitätsverlusten im Eisbad aufbewahrt.

ATP-Standardlösungen wurden selbst hergestellt, indem kristallines ATP als Dinatriumsalz (Serva, Heidelberg) auf der Mikrowaage gewogen und mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 10 ng ATP/1 ml verdünnt wurde. Nach dem Verdünnen wurden Aliquote in Glasfläschchen gefüllt und bei -20° C im Eisschrank gelagert, wo sie sich für einige Monate als stabil erwiesen. Aufgetaute Standardlösungen blieben im Eisbad für einige Stunden stabil. Eigene Vorversuche bestätigten die Ergebnisse früherer Arbeiten (PATTERSON et al. 1970; LUMAC APPLICATION BULLETIN 1977) über die Instabilität wiederholt eingefrorener und aufgetauter Standardlösungen.

Zur eigentlichen ATP-Messung wurden 50 µl Plaquesuspension in eine Glasküvette pipettiert, die gleiche Menge an NRB[®]-Reagenz dazugegeben und unter vorsichtigem Schütteln für exakt 60 Sekunden inkubiert. Die Einwirkungszeit von 60 Sekunden hatte sich in einleitenden Versuchen für die ATP-Freisetzung als optimal herausgestellt. Die Küvette wurde dann sofort in die Meßkammer des Photometers gestellt und der Meßvorgang mit der automatischen Zugabe der Lumit[®]-Lösung gestartet. Vor ihrer Benützung wurden alle Küvetten in der Spülmaschine gereinigt, anschließend mit RBS 50[®]-Lösung (Merck, Darmstadt) und destilliertem Wasser gespült und sorgfältig getrocknet.

Für sämtliche Experimente wurde am Instrument, das während der Versuche vor direkter Lichteinwirkung geschützt war, ein hoher Empfindlichkeitsbereich und eine integrierende Messung über 10 Sekunden vorgewählt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Methode

der internen Standardisierung durch Zusatz von 100 μ l ATP-Standard (LUMAC APPLICATION BULLETIN 1977). Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt; die ATP-Werte, die im Kapitel Ergebnisse aufgeführt sind, stellen die Mittelwerte aus jeweils 3 Einzelmessungen dar. Die maximale Empfindlichkeit der Versuchsanordnung liegt bei $40 \cdot 10^{-15}$ Mol ATP (LUMAC INSTRUCTION 1978), so daß in einer 50 μ l Probe noch 20 Picogramm ATP nachweisbar sind.

4. Vitalfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

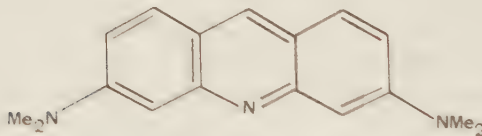


Abb. 2: Acridinorange (gezeichnet nach ALBERT 1966).

50 mg des basischen Vitalfarbstoffes Acridinorange (Merck, Darmstadt) wurden in einen Meßkolben gegeben, mit physiologischer Kochsalzlösung auf 500 ml aufgefüllt und zur Erzielung einer homogenen Verteilung gründlich geschüttelt. 1 ml der verdünnten Plaquesuspension wurden 80 μ l der Acridinorange-Lösung zugesetzt. Von den angefarbten Suspensionen wurden Deckglaspräparate hergestellt, die bei 1000-facher Vergrößerung in einem Zeiss Standard Mikroskop mit Fluoreszenz-Auflichtkondensor IV FI und Quecksilber-Höchstdrucklampe betrachtet wurden. Mit Hilfe eines Meßokulars wurden von jedem Präparat wahllos zwanzig Gesichtsfelder ausgezählt. Auf die Beobachtungen und Untersuchungen von STRÜGGER (1940) zurückgreifend, wurden kupferrot fluoreszierende Bakterien als abgestorben, grün

fluorochromierte Zellen als lebend gewertet. Nach Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen wurde der prozentuale Anteil an lebenden und toten Bakterienzellen in der untersuchten Plaqueprobe ermittelt.

D. Ergebnisse

1. Beziehung zwischen Lichtintensität und ATP-Konzentration

Um die Proportionalität zwischen der Lichtintensität und der ATP-Konzentration zu prüfen, wurde die Lichtausbeute von ATP-Standardlösungen unterschiedlicher Konzentration (1 ng, 10 ng, 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng ATP/10 μ l destilliertem Wasser) mit dem Photometer erfaßt. Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, besteht eine lineare Beziehung zwischen der Lumineszenz und der ATP-Konzentration.

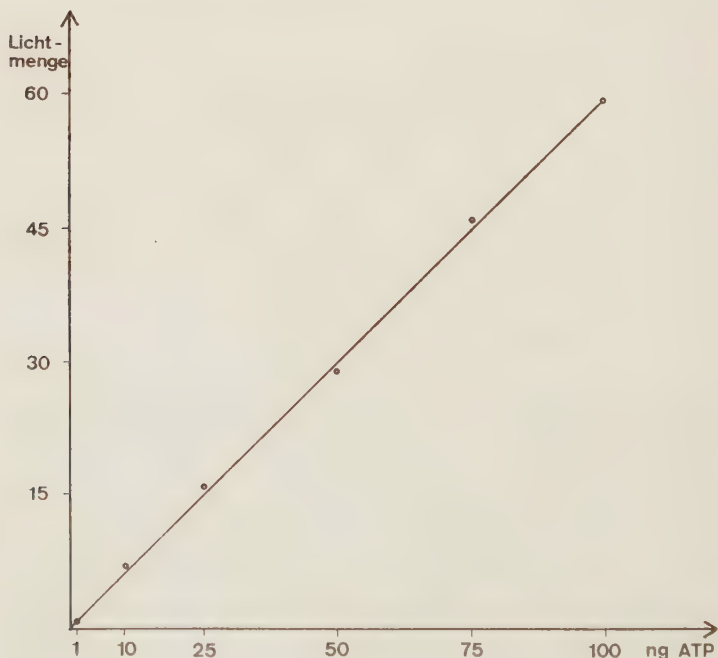


Abb. 3: Proportionalität zwischen der Lichtintensität und der ATP-Konzentration. Die Lichtmenge ist quantifiziert in relativen Lichteinheiten (LUMAC APPLICATION BULLETIN 1977).

2. ATP-Gehalt der Plaque nach Ultraschallbehandlung

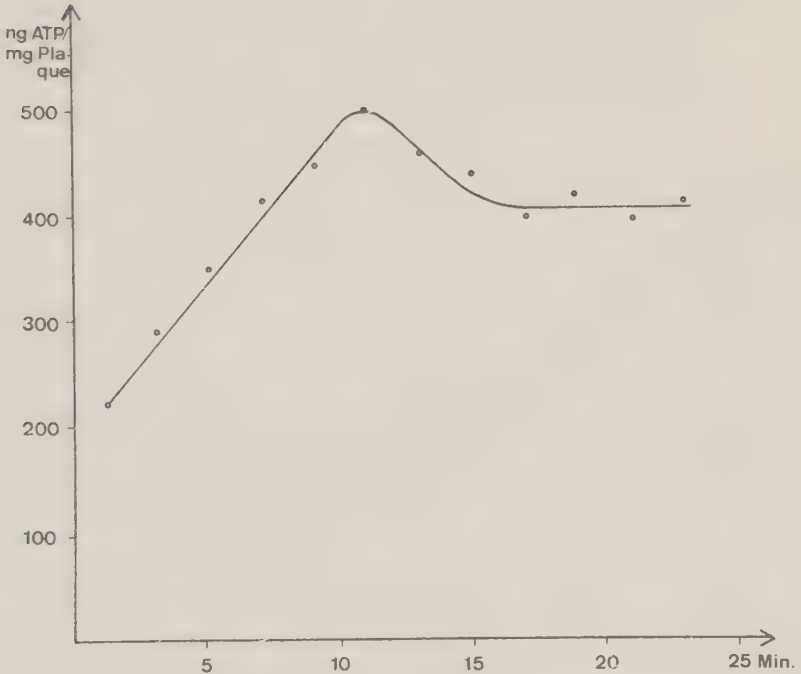


Abb. 4: ATP-Spiegel der Plaque nach Ultraschallbehandlung. Ultraschalleinwirkung (2 x 10 Sekunden) zum Zeitpunkt 0.

Da die Ultraschallbehandlung für eine ausreichende Homogenisierung der Plaqueproben unumgänglich war, erschien es notwendig, die dadurch verursachten Änderungen im ATP-Spiegel der Plaque quantitativ zu verfolgen. Wie Abbildung 4 zeigt, steigt der ATP-Gehalt der Plaque in den ersten 11 Minuten von einem Minimalwert unmittelbar nach der Ultraschallbehandlung (2 x 10 Sekunden) steil bis zu einem Maxi-

mum an, um dann auf einen etwas niedrigeren, konstanten Spiegel abzusinken. Der im Anschluß an die Homogenisierung gefundene ATP-Gehalt beträgt nur etwa 60 % des ATP-Wertes, der nach einer Erholungszeit der Bakterien von 15 - 20 Minuten gemessen wurde.

3. Stabilität von ATP in der Plaque

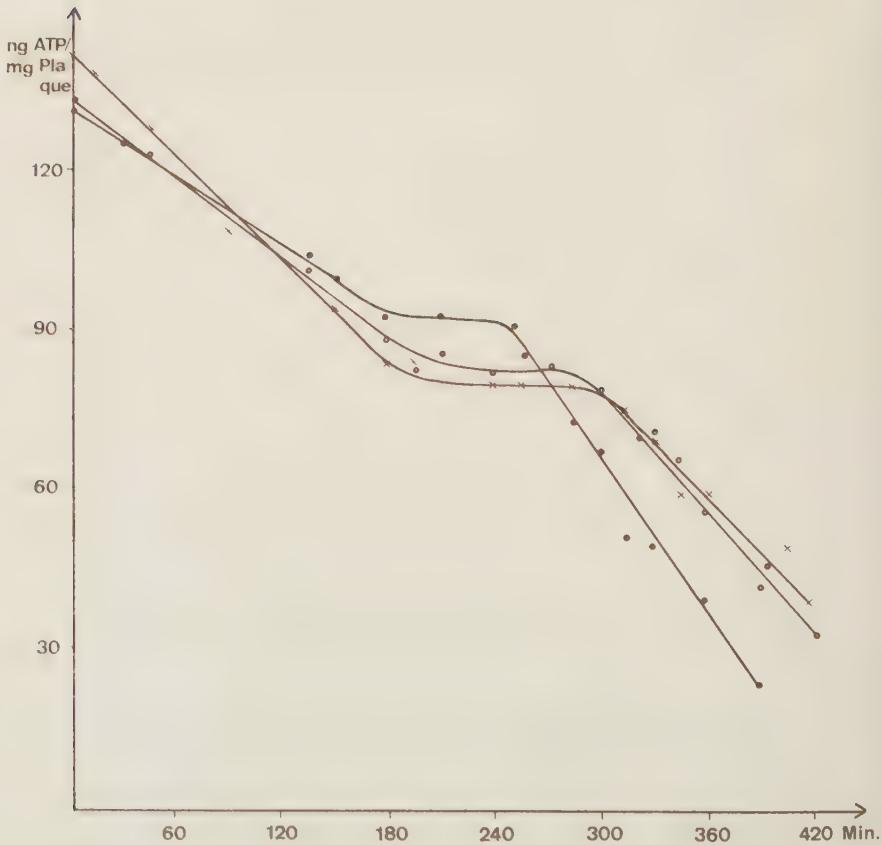


Abb. 5: Abfall der ATP-Konzentration in Plaque während der Lage-

rung bei Raumtemperatur. ●—● Plaqueprobe Proband Nr. 14, ○—○ Plaqueprobe Proband Nr. 15, ×—× Plaqueprobe Proband Nr. 18.

Obwohl zwischen Plaqueentnahme und ATP-Bestimmung nur ein kurzer Zeitraum lag, wurde in einer Versuchsreihe der Einfluß der Liegezeit (bei Zimmertemperatur) auf die ATP-Konzentration untersucht. Wie aus den 3 Kurven in Abbildung 5 zu ersehen, kommt es in den ersten 3 Stunden nach der Plaquegewinnung zu einer gleichmäßigen, starken Abnahme des ATP-Gehaltes. Der nach 3 Stunden erreichte Wert bleibt für ungefähr 2 Stunden konstant, ehe ein weiterer rapider Abfall in der ATP-Konzentration eintritt.

4. ATP-Gehalt der Plaque

Tabelle 2 und Abbildung 6 zeigen die aus 28 Plaqueproben experimentell erhaltenen Werte in ng ATP/mg Plaque Naßgewicht. Die gefundenen Daten schwanken um einen Mittelwert von $\bar{x} = 136,88$ ng ATP/mg Naßgewicht Plaque; die empirische Standardabweichung s beträgt 66,49 ng ATP/mg Plaque Naßgewicht.

Tabelle 2: ATP-Gehalt von 28 Plaqueproben.

Proband Nr.	ng ATP/mg Plaque
1	38,52
2	41,14
3	47,05
4	57,92
5	74,33
6	79,21
7	92,61
8	94,56
9	96,85

Tabelle 2 (Fortsetzung):

Proband Nr.	ng ATP/mg Plaque
10	97,81
11	109,45
12	119,17
13	125,78
14	131,40
15	133,57
16	135,04
17	135,68
18	140,90
19	149,85
20	160,08
21	168,66
22	173,48
23	192,49
24	220,28
25	222,22
26	245,90
27	254,91
28	293,95

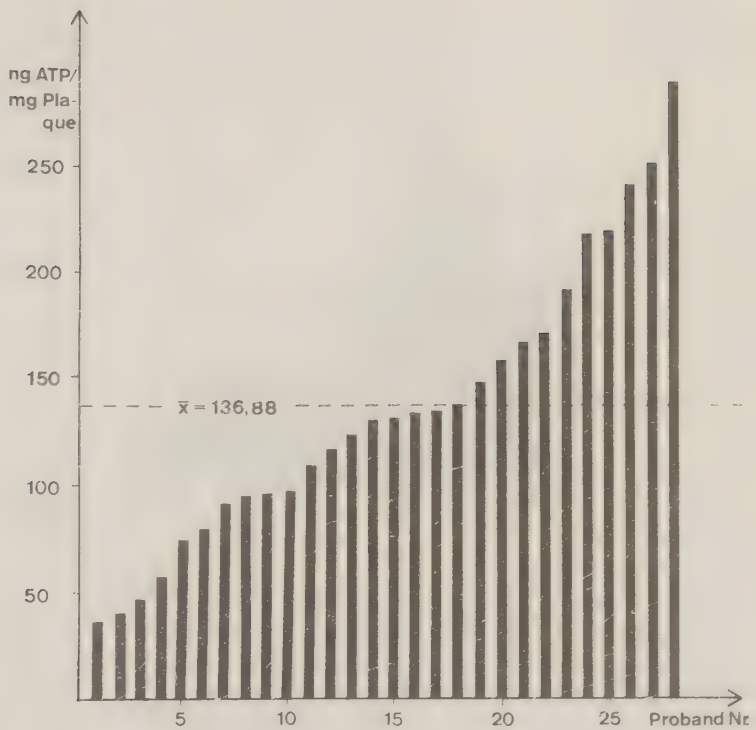


Abb. 6: ATP-Gehalt von 28 Plaqueproben. Graphische Darstellung zu Tabelle 2. $\bar{x}$ = Mittelwert.



Abb. 7: Graphische Darstellung der aus den Meßwerten (Tabelle 2 bzw. Abbildung 6) resultierenden Häufigkeitsverteilung. Bei einer Gruppierung der Daten durch $\bar{x} \pm \frac{s}{2}$ liegen 68 % aller Werte innerhalb von $\bar{x} \pm s$. $\bar{x}$ = Mittelwert = 136,88 ng ATP/mg Plaque Naßgewicht, s = Standardabweichung = 66,49 ng ATP/mg Plaque Naßgewicht.

5. ATP-Gehalt der Plaque als Funktion des Plaquealters

Wie aus Abbildung 8 zu entnehmen ist, steigt der ATP-Gehalt in der jungen Plaque bei allen 4 Probanden bis zu einem Maximum nach 24 Stunden an, um anschließend wieder abzufallen und nach 48 - 72 Stunden einen etwa konstanten Wert zu erreichen.

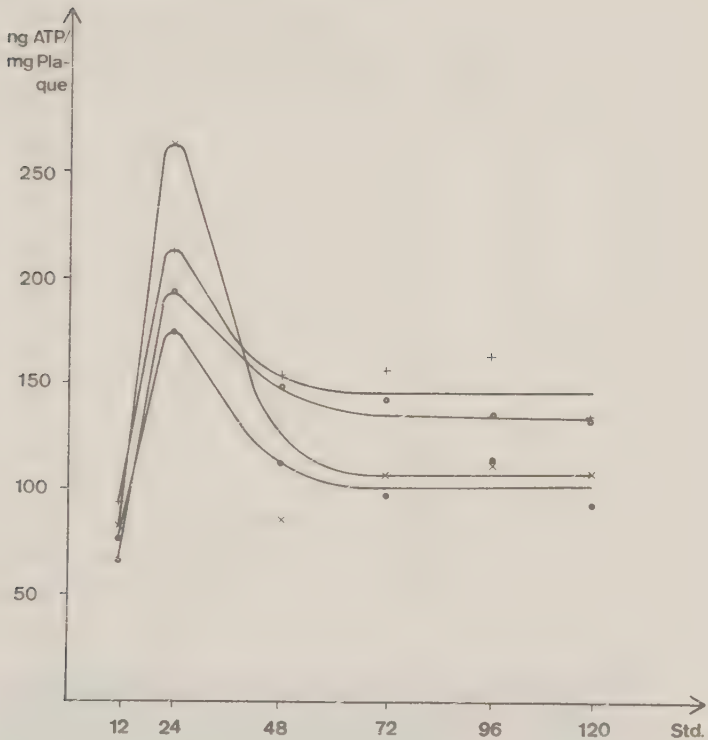


Abb. 8: ATP-Spiegel der Plaque in Abhängigkeit vom Plaquealter. Plaqueentnahme und ATP-Bestimmung 12, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden nach sorgfältiger Reinigung der Zähne. ●—● Proband A, ×—× Proband B, ○—○ Proband C, +—+ Proband D.

6. Fluoreszenzmikroskopie

Tabelle 3: Prozentuales Verhältnis lebender und toter Mikroorganismen in 40 angefärbten und fluoreszenzmikroskopisch untersuchten Plaqueproben. Die aufgeführten Prozentzahlen stellen Mittelwerte aus

jeweils 20 ausgezählten Gesichtsfeldern dar.

Proband Nr.	% lebende Bakterien	% tote Bakterien
1	80,5	19,5
2	85,9	14,1
3	85,7	14,3
4	77,0	23,0
5	86,5	13,5
6	78,1	21,9
7	80,6	19,4
8	82,6	17,4
9	74,1	25,9
10	88,3	11,7
11	84,1	15,9
12	81,2	18,8
13	78,9	21,1
14	83,4	16,6
15	87,0	13,0
16	75,2	24,8
17	82,4	17,6
18	85,1	14,9
19	85,7	14,3
20	78,6	21,4
21	85,8	14,2
22	83,9	16,1
23	73,9	26,1
24	84,5	15,5
25	83,9	16,1
26	86,6	13,4
27	87,3	12,7
28	85,5	14,5
29	88,7	11,3
30	83,4	16,6

Tabelle 3 (Fortsetzung):

Proband Nr.	% lebende Bakterien	% tote Bakterien
31	81,1	18,9
32	79,8	20,2
33	78,8	21,2
34	80,6	19,4
35	83,0	17,0
36	87,2	12,8
37	79,8	20,2
38	79,4	20,6
39	81,0	19,0
40	84,4	15,6

Aus den vorliegenden Werten läßt sich bei einer mittleren Standardabweichung von $s = 3,8 \%$ für die Prozentzahl lebender Plaquebakterien ein Mittelwert von $\bar{x} = 82,5 \%$ errechnen, für die abgestorbenen Bakterienzellen ein Mittelwert von $\bar{x} = 17,5 \%$.

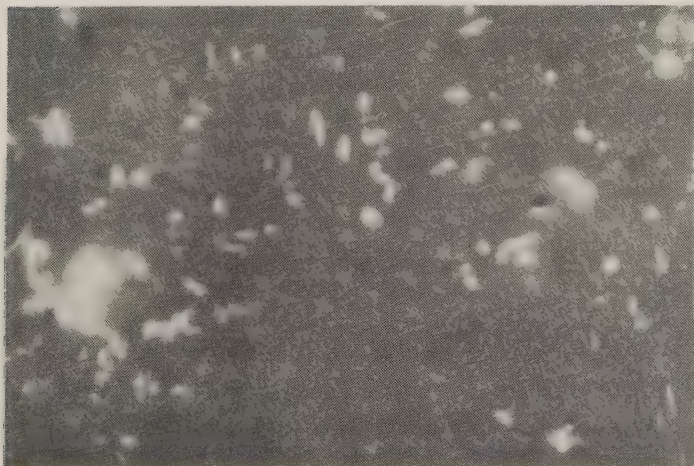


Abb. 9: Plaqueprobe nach Vitalfärbung mit Acridinorange. Darstellung

im Fluoreszenzmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung. Die geringe Bildqualität ist auf die Benützung eines älteren Leitz Mikroskopes zurückzuführen, da für das Zeiss Standard Mikroskop, das für alle übrigen Untersuchungen verwendet wurde, kein Photoaufsatz zur Verfügung stand. Auf der Aufnahme sind aber deutlich gelb oder grün gefärbte, lebende Bakterienzellen von wenigen kupferrot leuchtenden, toten Bakterien zu unterscheiden.

E. Diskussion

Die unter dem Kapitel Ergebnisse in Abbildung 3 aufgezeigte lineare Beziehung zwischen der Lichtintensität und der ATP-Konzentration bildet die Grundlage für die ATP-Bestimmung mit der Luciferin-Luciferase Reaktion, stellt aber keine Eichkurve im eigentlichen Sinn dar, aus der man für jede beliebige Plaqueprobe zu der am Photometer abgelesenen Lichtmenge die ATP-Konzentration erhält. Da die gelieferten Lumit[®]-Enzympräparate wechselnde Aktivitäten aufweisen und auch in den einzelnen Plaqueproben in unterschiedlichem Ausmaß Störfaktoren auftreten, die entweder die Luciferasereaktion unterdrücken (Ionen) oder durch Photonenabsorption die Lichtausbeute schmälern (Trübung, Farbe), muß für jede Analyse durch interne Standardisierung die ATP-Konzentration ermittelt werden.

Ähnlich wie starke Temperaturschwankungen, Zentrifugieren oder Filtrieren bedeutet auch die Behandlung mit Ultraschall für die Bakterien eine Stresssituation, die sich sofort im mikrobiellen Stoffwechsel und damit auch im zellulären ATP-Gehalt widerspiegelt (CHAPMAN und ATKINSON 1977). Als Bestätigung dieser Erkenntnisse fanden COLE et al. (1967) bei ihren Untersuchungen über den Einfluß der Aufbereitungstechniken eine durch Zentrifugieren verursachte drastische Abnahme des ATP-Pools bei *Escherichia coli* um 50 %. Sie führten den Abfall auf eine im Vergleich zu den ATP-verbrauchenden Prozessen größere Empfindlichkeit der ATP-produzierenden Stoffwechselreaktionen gegenüber stressenden Behandlungsmethoden zurück. Da für eine hinreichende Homogenisierung der Plaqueproben die Ultraschallbehandlung aber unvermeidlich ist, müssen hierdurch bedingte Abweichungen im ATP-Gehalt quantitativ erfaßt (Abbildung 4) und berücksichtigt werden. Trotz kurzer Einwirkungszeit des Ultraschalls (2 x 10 Sekunden) bei niedrigster Leistung dauerte es immerhin 15 - 20 Minuten, bis sich die Plaquebakterien erholt und ihren vermutlichen Ausgangs-ATP-Spiegel wiedererreicht hatten. Die Zeit von 15 - 20 Minuten übertrifft deutlich die von CHAPMAN und ATKINSON (1977) nach Fil-

trierungen gefundene Erholungszeit der Bakterien von 2 - 3 Minuten. Die unterschiedlichen Zeitspannen könnten entweder durch eine ungleiche Empfindlichkeit der an den Versuchen beteiligten Bakterienarten gegenüber störenden Einflüssen oder durch eine stärkere Belastung der Mikroben durch den Ultraschall bedingt sein.

Der bei anhaltender Aufbewahrungszeit zu beobachtende steile Abfall der ATP-Konzentration in der Plaque (Abbildung 5) dürfte durch die geänderten Lebensbedingungen für die Plaquebakterien verursacht sein. Durch den Übergang von den überwiegend anaeroben Verhältnissen in der Plaque der Mundhöhle (STRALFORS 1950) zu den aeroben Bedingungen in der Plaquesuspension kommt es zu einem Absterben der anaeroben Bakterien (LOESCHE 1969) und einem Zerfall des ATPs. Das nach etwa 3 Stunden registrierte Plateau im Kurvenverlauf könnte mit einer Stabilisierung der Zellzahl gedeutet werden. Nach Erschöpfung der als Reservekohlehydrate dienenden intrazellulären Polysaccharide und extrazellulären Lävane durch die verbliebenen aeroben Bakterien kommt es dann zu einer weiteren Abnahme des ATP-Gehaltes.

Aus Abbildung 5 ergibt sich die zwingende Notwendigkeit einer möglichst kurzen und einheitlichen Zeitspanne zwischen Plaqueentnahme und ATP-Bestimmung bei allen Versuchen, da verschieden lange Aufbereitungszeiten zu unterschiedlichen Meßwerten führen. Andererseits zeigt der Verlauf der Kurve in Abbildung 4, daß erst 15 - 20 Minuten nach der Ultraschallbehandlung der vermeintliche Ausgangswert wiedererreicht ist, jedoch bereits nach 6 - 7 Minuten ein ATP-Gehalt gemessen wird, der dem ursprünglichen ATP-Spiegel entspricht. Für die praktische Durchführung der folgenden Versuchsreihen resultierte daraus ein Zeitmaß von etwa 10 Minuten für die Aufbereitung der Plaques und ein Zeitraum von 6 - 7 Minuten zwischen Ultraschallbehandlung und ATP-Bestimmung.

Bei der Untersuchung des ATP-Gehaltes in Abhängigkeit vom Alter der Plaque ergab sich für die ersten Stunden nach der Zahnreinigung die

Schwierigkeit, wägbare Plaquemengen zu gewinnen. In dieser Situation zeigte sich die gegenüber dem Photometer um 2 Größenordnungen geringere Empfindlichkeit der Mikrowaage als begrenzender Faktor der Versuchsanordnung, so daß erst nach 12 Stunden die erste ATP-Messung durchgeführt werden konnte.

Die ATP/Zeit-Kurve der Abbildung 8 mit einem Maximum nach 24 Stunden und einem nachfolgenden, geringen Abfall bis zu einem konstanten Wert nach 48 - 72 Stunden läßt sich anschaulich mit dem mikrobiellen Wachstum in der Plaque erklären. Das Anfangsstadium der Plaquebildung ist durch logarithmisches Wachstum gekennzeichnet, die Bakterienzellen weisen eine maximale Teilungsrate auf, die mit einem konstanten Anstieg des ATP-Pools einhergeht. Mit zunehmender Plaquemenge wird das diffusionskontrollierte Nährstoffangebot in den tieferen Schichten der Plaque eingeschränkt, das Wachstum der Plaquebakterien nimmt ab und kommt endlich zum Stillstand. Dieses Stadium, das durch eine etwa konstante ATP-Konzentration charakterisiert ist, erinnert an die stationäre Wachstumsphase einer statischen Bakterienkultur. Bei ihren Untersuchungen über den ATP-Gehalt von Bakterienreinkulturen kamen COLE et al. (1967) mit *Escherichia coli*, FORREST (1965) mit *Streptococcus faecalis* und RIEDL (1981) mit *Streptococcus mutans* zu gleichlautenden Ergebnissen.

Für die Praxis ergibt sich aus den ATP/Zeit-Kurven ferner die Möglichkeit, durch mehrere im Abstand einiger Stunden durchgeführte Probenmessungen einen Rückschluß auf das Alter und das momentane Wachstumsstadium der Plaque zu erhalten.

Die Abhängigkeit der ATP-Konzentration vom Alter der Plaque erklärt zum Teil auch die in Abbildung 7 dargestellte Häufigkeitsverteilung der ATP-Werte. Da die Auswahl der Probanden willkürlich erfolgte, sind mit Sicherheit Plaques aller Reifegrade und damit verschiedener ATP-Konzentrationen entnommen und ausgewertet worden. Daneben tragen aber auch individuelle Unterschiede in der bakteriellen Zu-

sammensetzung der Plaque, die Existenz ausgeprägter ökologischer Nischen mit wechselnden Bakterienpopulationen innerhalb einer Mundhöhle (BOWDEN et al. 1975) und der individuelle Kohlehydratkonsum zur Streuung der ATP-Werte bei.

Trotz dieser Einschränkungen ist dem ATP-Gehalt für zukünftige Untersuchungen eine angemessene Bedeutung als Bezugsgröße für die Plaquemenge zuzuschreiben. Der Vorzug dieser Technik liegt in der außerordentlich geringen Plaquemenge, die für eine Messung benötigt wird. So genügt zur Bestimmung des ATP-Gehaltes bereits eine Plaquemenge mit einem Naßgewicht von etwa 0,3 µg. Daraus ergibt sich die besondere Anwendungsmöglichkeit des Verfahrens bei der Erforschung der jungen Plaque, da die zur Messung der bisherigen Standardgrößen wie Naßgewicht, Trockengewicht oder Stickstoffgehalt erforderlichen Plaquemengen in diesem Stadium noch nicht vorhanden sind.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden bisher im allgemeinen die aus den lebensfähigen Zellen in einem Nährmedium hervorgehenden Kolonien ausgezählt. Die äußerst zeitaufwendige Plattenzähltechnik konfrontiert den Untersucher mit dem Problem einer unzureichenden Trennung der kolonienbildenden Einzelbakterien und einer sich daraus ergebenden Unterschätzung der Lebendzellzahl (D'EUSTACHIO und JOHNSON 1968).

Die universelle Verbreitung des ATPs in allen lebenden Zellen (HUENNEKENS und WHITELY 1960) und der rasche Zerfall in abgestorbenen Zellen weisen diese Verbindung als einen hervorragenden Indikator für die bakterielle Biomasse aus. In der Literatur (LUMIT PRELIMINARY APPLICATION 511, 1978) sind für die meisten Bakterienarten ATP-Spiegel von 0,3 bis 3 Femtogramm pro Zelle aufgeführt, woraus sich für gemischte Populationen, wie sie auch die Zahnplaque darstellt, ein Wert von 0,5 fg ATP/Zelle ableitet (D'EUSTACHIO und JOHNSON 1968; D'EUSTACHIO et al. 1968; TIFFT und SPIEGEL 1976). Aus dem Mittelwert von 136,88 ng ATP/mg Plaque Naßgewicht errechnet sich

danach eine Lebendbakterienzahl von $2,73 \cdot 10^8$ pro mg Plaque Naßgewicht.

Wenn auch die Angaben über den prozentualen Anteil der Streptokokken an der insgesamt kultivierbaren Plaqueflora zwischen 38 und 70 % schwanken (STRALFORS 1950; FROSTELL 1960; LOESCHE et al. 1972), so zeigen die Ergebnisse eingehender Forschungsarbeiten die Streptokokken doch als die zahlenmäßig stärkste Bakterienspezies in der Plaque. Es bietet sich deshalb an, anstelle des doch recht ungenauen Durchschnittswertes von 0,5 fg ATP/Zelle den ATP-Gehalt einer Streptokokkenzelle als Grundlage für die Berechnung der Lebendzellzahl heranzuziehen. Aus den im Schrifttum aufgeführten Daten von 0,57 fg ATP/Zelle für *Streptococcus salivarius* (LEVIN et al. 1967), 1,0 fg ATP/Zelle für die Streptokokkenspezies (THORE et al. 1975) und 1,54 fg ATP/Zelle für *Streptococcus sanguis* (ROBRISH et al. 1978) läßt sich ein Mittelwert von 1,03 fg ATP/Streptokokkenzelle errechnen. Legt man diesen Wert für die Ermittlung der Lebendbakterienzahl zugrunde, so erhält man aus dem mittleren ATP-Gehalt der Plaque von 136,88 ng ATP eine Anzahl von $1,32 \cdot 10^8$ lebenden Mikroorganismen/mg Plaque Naßgewicht.

Obwohl STRUGGER (1940) bei seinen experimentellen Untersuchungen über die Speicherung des Acridinorange sogar lokale, nekrotische Stellen des Zellplasmas durch die unterschiedliche Fluoreszenz von ungeschädigten Zellteilen abgrenzen konnte, fehlte es nicht an kritischen Anmerkungen zu dieser Färbetechnik (BUCHERER 1943). Eigene Versuche mit hitzegetöteten Streptokokkenkulturen brachten jedoch eine Bestätigung der STRUGGER'schen Färbeergebnisse. Trotzdem wurde bei den nachfolgenden Versuchen durch Verwendung stets gleichgroßer Farbstoffvolumina und Farbstoffkonzentrationen sowie ähnlicher Plaquemengen der Kritik Rechnung getragen.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Versuche zeigte einen mittleren Anteil von 82,5 % lebenden und 17,5 % abgestorbenen Bakterienzellen

in der Plaque. Hierbei ist von Interesse, daß dieses Prozentverhältnis unter Berücksichtigung geringer Schwankungen auch in allen mikroskopierte Proben während der 5-Tage-Versuche gefunden wurde. Frühere Untersuchungen über den Anteil der lebensfähigen Zellen an der Gesamtzellzahl, die mit der herkömmlichen Plattenzähltechnik durchgeführt wurden, brachten allenfalls Quoten von 23 - 49 % (SOCRANSKY et al. 1963; POOLE und GILMOUR 1971; LOESCHE et al. 1972), nur GORDON et al. (1971) erreichten unter Einhaltung strenger anaerober Bedingungen mit 70,4 % einen Wert, der dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit nahekommt. Die großen Differenzen zwischen Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl führen POOLE und GILMOUR (1971) auf eine ungenügende Dispergierung der Zellhaufen und unzulängliche Kulturbedingungen zurück.

Aus der Lebendzellzahl von $1,32 \cdot 10^8$ pro mg Plaque Naßgewicht und dem durchschnittlichen Anteil der lebenden Mikroorganismen von 82,5 % resultiert eine Gesamtzellzahl von $1,60 \cdot 10^8$ pro mg Plaque Naßgewicht. In Übereinstimmung mit den Werten von SOCRANSKY et al. (1963) und LOESCHE et al. (1972) bestätigt dieses Ergebnis die Auffassung von der Plaque als dichtgedrängte Bakterienmasse.

F. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Luciferin-Luciferase Biolumineszenz Reaktion der ATP-Gehalt von Plaque bestimmt. Nach methodischen Untersuchungen, die die Abhängigkeit der Lichtintensität von der ATP-Konzentration, die Änderungen des ATP-Spiegels nach Ultraschallbehandlung und die Stabilität von ATP in der Plaque betrafen, wurde der ATP-Gehalt von 28 Plaqueproben gemessen. Zur Bestimmung der Relativzahlen von lebenden und toten Plaquebakterien wurden 40 Proben mit dem Vitalfarbstoff Acridinorange angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem extrahierbaren ATP-Gehalt und dem Plaque Naßgewicht. Der Mittelwert von 136,88 ng ATP/mg Plaque Naßgewicht zeichnet den ATP-Gehalt als Bezugsgröße für die Plaquemenge aus. Die Untersuchung der ATP-Konzentration in Abhängigkeit vom Alter der Plaque zeigte ein Maximum nach 24 Stunden, an das sich ein geringer Abfall anschloß, der nach 24 - 48 Stunden zu einem etwa konstanten Wert führte.
2. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergab einen Anteil von 82,5 % lebenden und 17,5 % abgestorbenen Bakterien.

Aus dem durchschnittlichen ATP-Gehalt ließ sich eine Lebendzellzahl von $1,32 \cdot 10^8$ pro mg Plaque Naßgewicht ermitteln. Die Kenntnis vom prozentualen Anteil der lebensfähigen Mikroorganismen erlaubte die Berechnung einer Gesamtzellzahl von $1,60 \cdot 10^8$ pro mg Plaque Naßgewicht.

G. Schrifttum

- ADDANKI, S., SOTOS, J.F. and REARICK, P.D.: Rapid determination of picomole quantities of ATP with a liquid scintillation counter. *Analyt. Biochem.* 14, 261 (1966).
- AHRENS, G., BRAMSTEDT, F. und NAUJOKS, R.: Zur Standardisierung einzelner Bezugsgrößen für biochemische Untersuchungen an Plaquematerial. In: Hardwick, J.L., Dustin, J.P. and Held, H.R.: *Advances in fluorine research and dental caries prevention*. Vol. 2, 167, Pergamon Press, Oxford 1964.
- AISENBERG, M.S. and AISENBERG, A.D.: Hyaluronidase and periodontal disease. *Oral. Surg.* 4, 317 (1951).
- ALBERT, A.: The acridines. Their preparation, physical, chemical and biological properties and uses. Clows and Sons, London and Beccles 1966.
- ASH, M.M., GITLIN, B.N. and SMITH, W.A.: Correlation between plaque and gingivitis. *J. Periodont.* 35, 424 (1964).
- BAUCHOP, T. and ELSDEN, S.R.: The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.* 23, 457 (1960).
- BELITSER, V.A. and TSYBAKOVA, E.T.: The mechanism of phosphorylation associated with respiration. *Biokhimiya* 4, 516 (1939).
- BERGMEYER, H.U.: *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1970.
- BEUTLER, E. and BALUDA, M.C.: Simplified determination of blood adenosine triphosphate using the firefly system. *Blood* Vol. 23, 5, 688 (1964).
- BITLER, B. and MC ELROY, W.D.: The preparation and properties of crystalline firefly luciferin. *Arch. Biochem. Biophys.* 72, 358 (1957).
- BOWDEN, G.H., HARDIE, J.M. and SLACK, G.L.: Microbial variations in approximal dental plaque. *Caries Res.* 9, 253 (1975).
- BUCHERER, H.: Experimentelle Untersuchungen über die Fluoreszenzfärbung toter und lebender Bakterien nach Strugger. *Zentralblatt für Bakt. etc.* II. Abt. Bd. 106, 5/7, 81 (1943).

- CHAPMAN, A.G. and ATKINSON, D.E.: Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast. In: Rose, A.H. and Tempest, D.W.: Advances in microbial physiology. Vol. 15, 253, Academic Press, London and New York 1977.
- CHAPMAN, A.G., FALL, L. and ATKINSON, D.E.: Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J. Bacteriol.* Vol. 108, 3, 1072 (1971).
- CHAPPELLE, E.W. and LEVIN, G.V.: Use of the firefly bioluminescent reaction for rapid detection and counting of bacteria. *Biochem. Med.* 2, 41 (1968).
- CHEER, S., GENTILE, J.H. and HEGRE, C.S.: Improved methods for ATP analysis. *Analyt. Biochem.* 60, 102 (1974).
- COBB, C.M. and BROWN, L.R.: The effects of exudate from the periodontal pocket on cell culture. *Periodontics* 5, 5 (1967).
- COHN, W.E. and CARTER, C.E.: The separation of adenosine polyphosphates by ion exchange and paper chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* 72, 4273 (1950).
- COLE, H.A., WIMPENNY, J.W.T. and HUGHES, D.E.: The ATP pool in *Escherichia coli*. I. Measurement of the pool using a modified luciferase assay. *Biochim. Biophys. Acta* 143, 445 (1967).
- CONN, R.B., CHARACHE, P. and CHAPPELLE, E.W.: Limits of applicability of the firefly luminescence ATP assay for bacteria in clinical specimens. *Amer. J. Clin. Pathol.* Vol. 63, 4, 493 (1975).
- CORTENBOSCH, R. and SCHRAM, E.: Improvements in the bioluminescence assay of ATP with firefly luciferase. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 79 (1971).
- D'EUSTACHIO, A.J. and JOHNSON, D.R.: Adenosine triphosphate content of bacteria. *Fed. Proc.* 27, 761 (1968).
- D'EUSTACHIO, A.J., JOHNSON, D.R. and LEVIN, G.V.: Rapid assay of bacterial populations. *Bacteriol. Proc.* 21, 13 (1968).
- D'EUSTACHIO, A.J. and LEVIN, G.V.: Levels of adenosine triphosphate during bacterial growth. *Bacteriol. Proc.* 67, 121 (1967).
- DHOPLE, A.M. and HANKS, J.H.: Quantitative extraction of adenosine

- triphosphate from cultivable and host-grown microbes: calculation of adenosine triphosphate pools. *Appl. Micro.* Vol. 26, 3, 399 (1973).
- DUBOIS, R., zit. bei Chase, A.M.: The measurement of luciferin and luciferase. *Meth. Biochem. Anal.* 8, 61 (1960).
- ENGELHARDT, W.A. and LJUBIMOVA, M.N.: Myosine and adenosinetriphosphatase. *Nature* 144, 668 (1939).
- FISKE, C.H. and SUBBAROW, Y.: Phosphorus compounds of muscle and liver. *Science* 70, 381 (1929).
- FORREST, W.W.: Adenosine triphosphate pool during the growth cycle in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* Vol. 90, 4, 1013 (1965).
- FROSTELL, G.: Studies in oral biochemical bacteriology. *Acta odont. scand.* 18, Suppl. 29 (1960).
- GADKARI, D. and STOLP, H.: Energy metabolism of *Bdellovibrio bacteriovorus*. I. Energy production, ATP pool, energy charge. *Arch. Microbiol.* 102, 179 (1975).
- GIBBONS, R.J.: Formation and significance of bacterial polysaccharides in caries etiology. *Caries Res.* 2, 164 (1968).
- GORDON, D.F., STUTMAN, M. and LOESCHE, W.J.: Improved isolation of anaerobic bacteria from the gingival crevice area of man. *Appl. Micro.* Vol. 21, 6, 1046 (1971).
- GREEN, A.A. and MC ELROY, W.D.: Crystalline firefly luciferase. *Biochim. Biophys. Acta* 20, 170 (1956).
- GÜLZOW, H.-J.: Die Mundhygiene in ihren Beziehungen zum marginalen Parodontium und zur Kariesfrequenz. *Dtsch. Zahn-, Mund- u. Kieferheilk.* 44, 97 (1965).
- HAMMERSTEDT, R.H.: An automated method for ATP analysis utilizing the luciferin-luciferase reaction. *Analyt. Biochem.* 52, 449 (1973).
- HARRISON, D.E.F. and MAITRA, P.: The role of ATP in the control of energy metabolism in growing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 53, Suppl. 7-8 (1968).
- HARVEY, E.N.: *Living light*. Princeton University Press, Princeton, N. J. 1940.
- HOLM-HANSEN, O.: Determination of microbial biomass in ocean profiles.

- Limnol. Oceanogr. 14, 740 (1969).
- HOLM-HANSEN, O. and BOOTH, C.R.: The measurements of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. Limnol. Oceanogr. 11, 510 (1966).
- HOLM-HANSEN, O. and PAERL, H.W.: The applicability of ATP determination for estimation of microbial biomass and metabolic activity. Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 29, Suppl. 149 (1972).
- HOLMS, W.H., HAMILTON, I.D. and ROBERTSON, A.G.: The rate of turnover of the adenosine triphosphate pool of *Escherichia coli* growing aerobically in simple defined media. Arch. Microbiol. 83, 95 (1972).
- HOPPERT, C.A., WEBBER, P.A. and CANNIFF, T.L.: The production of dental caries in rats fed adequate diet. Science 74, 77 (1931).
- HUENNEKENS, F.M. and WHITELY, H.R., zit. bei CHAPPELLE, E.W. and LEVIN, G.V.: Use of the firefly bioluminescent reaction for rapid detection and counting of bacteria. Biochem. Med. 2, 41 (1968).
- HURLBERT, R.B., SCHMITZ, H., BRUMM, A.F. and POTTER, V.R.: Nucleotide metabolism. II. Chromatographic separation of acid-soluble nucleotides, J. Biol. Chem. 209, 23 (1954).
- JANTZEN, H.: Das Adenosinphosphat-System während Wachstum und Entwicklung von *Acanthamoeba castellanii*. Arch. Microbiol. 101, 391 (1974).
- JOHNSON, M.J.: A rapid micromethod for estimation of nonvolatile organic matter. J. Biol. Chem. 181, 707 (1949).
- KAO, I.C., CHIU, S.Y., FAN, L.T. and ERICKSON, L.E.: ATP pools in pure and mixed cultures. J. Water Poll. Contr. Fed. 45, 1746 (1973).
- KARL, D.M. and HOLM-HANSEN, O.: Effects of luciferin concentration on the quantitative assay of ATP using crude luciferase preparations. Analyt. Biochem. 75, 100 (1976).
- KIMMICH, G.A., RANDLES, J. and BRAND, J.S.: Assay of picomole amounts of ATP, ADP and AMP using the luciferase enzyme system. Analyt. Biochem. 69, 187 (1975).
- KITE, O.W., SHAW, J.H. and SOGNAES, R.F.: The prevention of experimental tooth decay by tube-feeding. J. Nutr. 42, 89 (1950).
- KLOFAT, W., PICCIOLO, G., CHAPPELLE, E.W. and FREESE, E.: Production

- of adenosine triphosphate in normal cells and sporulation mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 244, 3270 (1969).
- LANG, C.A.: Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. *Analyt. Chem.* 30, 1692 (1958).
- LEE, C.C., HARRIS, R.F., WILLIAMS, J.D.H., ARMSTRONG, D.E. and SYERS, J.K.: Adenosine triphosphate in lake sediments. I. Determination. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 35, 82 (1971). II. Origin and significance. *Ibid*, 86 (1971):
- LEHNINGER, A.L.: Bioenergetik. Molekulare Grundlagen der biologischen Energieumwandlungen. Thieme Verlag, Stuttgart 1974.
- LEVIN, G.V., CHAN, C.S. and DAVIES, G.: Development of the firefly bioluminescent assay for the rapid quantitative detection of microbial contamination of water. Techn. Rep. TR-67-71, Aerospace Medical Research Laboratories, Wright-Patterson Air Force Space, Ohio 1967.
- LIPMANN, F.: Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv. Enzymol.* 1, 99 (1941).
- LIPMANN, F.: Biosynthetic mechanisms. *Harvey Lect.* 44, 99 (1950).
- LÖE, H., THEILADE, E. and JENSEN, S.B.: Experimental gingivitis in man. *J. Periodont.* 36, 177 (1965).
- LOESCHE, W.J.: Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Appl. Micro.* 18, 723 (1969).
- LOESCHE, W.J. and GREEN, G.E.: Comparison of various plaque parameters in individuals with poor oral hygiene. *J. Periodont. Res.* 7, 173 (1972).
- LOESCHE, W.J., HOCKETT, R.N. and SYED, S.A.: The predominant cultivable flora of tooth surface plaque removed from institutionalized subjects. *Archs. oral Biol.* 17, 1311 (1972).
- LUMAC APPLICATION BULLETIN. Lumac Systems AG, Basel 1977.
- LUMAC INSTRUCTION: Celltester model 1030. Lumac Systems AG, Basel 1978.
- LUMIT PRELIMINARY APPLICATION 511. Lumac Systems AG, Basel 1978.
- LUNDIN, A., RICKARDSSON, A. and THORE, A.: Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. *Analyt.*

- Biochem. 75, 611 (1976).
- LYMAN, G.E. and DE VINCENZO, J.P.: Determination of picogram amounts of ATP using the luciferin-luciferase enzyme system. *Analyt. Biochem.* 21, 435 (1967).
- MATHIS, R.R. and BROWN, O.R.: ATP concentration in *Escherichia coli* during oxygen toxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 440, 723 (1976).
- MC ELROY, W.D.: The energy source for bioluminescence in an isolated system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 33, 342 (1947).
- MC ELROY, W.D. and BALLENTINE, R.: The mechanism of bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 30, 377 (1944).
- MC ELROY, W.D. and SELIGER, H.H. In: Mc Elroy, W.D. and Glass, B.: A symposium on light and life. 219, Johns Hopkins Press, Baltimore 1961.
- MC ELROY, W.D. and STREHLER, B.L.: Factors influencing the response of the bioluminescent reaction to adenosine triphosphate. *Arch. Biochem.* 22, 420 (1949).
- MERGENHAGEN, S.E., TEMPEL, T.R. and SNYDERMAN, R.: Immunologic reactions and periodontal inflammation. *J. dent. Res.* 49, 256 (1970).
- MURPHY, P.J. and STALLARD, R.E.: An altered gingival attachment epithelium; a result of the enzyme hyaluronidase. *Periodontics* 6, 105 (1968).
- NIELSEN, R. and RASMUSSEN, H.: Fractionation of extracts of firefly tails by gel filtration. *Acta Chem. Scand.* 22, 1757 (1968).
- OELZE, J. and KAMEN, M.D.: Adenosine triphosphate cellular levels in *Rhodospirillum rubrum* during transition from aerobic to anaerobic metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 234, 137 (1971).
- O'LEARY, T.J., SHANNON, I.L. and PRIGMORE, J.R.: Clinical correlations and systemic status in periodontal disease. *S. Calif. Dent. J.* 30, 47 (1962).
- OLEINIKOV, R.R., SOTNIKOV, G.G., SHEMAKHANOVA, N.M. and BELOV, J.M.: The content of ATP in the cells of *Rhizobium* strains with a high and low activity. *Mikrobiologiya* 40, 971 (1971).
- PATTERSON, J.W., BREZONIK, P.L. and PUTNAM, H.D.: Measurement and significance of adenosine triphosphate in activated sludge. *Env.*

- Sci. and Technol. 4, 569 (1970).
- PETROVA, G.V., ROMANOVA, A.K. and MALYAN, A.N.: ATP content in the cells of hydrogen bacterium *Hydrogenomonas eutropha*. Mikrobiologiya 45, 179 (1976).
- POOLE, A.E. and GILMOUR, M.N.: The variability of unstandardized plaques obtained from single or multiple subjects. Archs. oral Biol. 16, 681 (1971).
- RANKE, E., RANKE, B., AHRÉNS, G. und HEESCHEN, W.: Plaqueflora und Zahnkaries. Dtsch. zahnärztl. Z. 22, 883 (1967).
- RASMUSSEN, H. and NIELSEN, R.: An improved analysis of adenosine triphosphate by the luciferase method. Acta Chem. Scand. 22, 1745 (1968).
- RENGGLI, H.H.: Die Zahnfleischentzündung - ein Modell destruktiver Gewebsvorgänge. Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 85, 769 (1975).
- RIEDL, R. Med. Diss., Erlangen 1981.
- RIETHE, P.: Plaques und Zahnstein in ihren Beziehungen zum marginalen Parodontium. Dtsch. zahnärztl. Z. 24, 915 (1969).
- ROBERTON, A.M. and WOLFE, R.S.: Adenosine triphosphate pools in *Methanobacterium*. J. Bacteriol. Vol. 102, 1, 43 (1970).
- ROBINSON, H.W. and HOGDEN, C.G.: The biuret reaction in the determination of serum proteins. J. Biol. Chem. 135, 707 (1940).
- ROBRISH, S.A., KEMP, C.W. and BOWEN, W.H.: Use of extractable adenosine triphosphate to estimate the viable cell mass in dental plaque samples obtained from monkeys. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 35, 4, 743 (1978).
- SCHÖN, G.: Der Einfluß der Kulturbedingungen auf den ATP-, ADP- und AMP-Spiegel bei *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Microbiol. 66, 348 (1969).
- SCHULTZ-HAUDT, S., BIBBY, B.G. and BRUCE, M.A.: Tissue destructive products of gingival bacteria from non-specific gingivitis. J. dent. Res. 33, 624 (1954).
- SELIGER, H.H. and MC ELROY, W.D.: Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. Arch. Biochem. Biophys. 88, 136 (1960).
- SELIGER, H.H. and MC ELROY, W.D.: Light - physical and biological

- action. 168, Academic Press, New York 1965.
- SHARPE, A.N., WOODROW, M.N. and JACKSON, A.K.: Adenosinetriphosphate levels in foods contaminated by bacteria. J. Appl. Bact. 33, 758 (1970).
- SNYDERMAN, R.: Immunological mechanisms of periodontal tissue destruction. J. Amer. dent. Ass. 87, 1020 (1973).
- SOCRANSKY, S.S.: Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J. dent. Res. 49, 203 (1970).
- SOCRANSKY, S.S., GIBBONS, R.J., DALE, A.C., BORTNICK, L., ROSENTHAL, E. and MAC DONALD, J.B.: The microbiota of the gingival crevice area of man. I. Total microscopic counts, viable counts and counts of specific organisms. Arch. oral Biol. 8, 275 (1963).
- SOGNAES, R.F.: Is the susceptibility to dental caries influenced by factors operating during the period of tooth development? J. Calif. dent. Ass. 26, 37 (1950).
- STANLEY, P.E. and WILLIAMS, S.G.: Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. Analyt. Biochem. 29, 381 (1969).
- ST. JOHN, J.B.: Determination of ATP in Chlorella with the luciferin-luciferase enzyme system. Analyt. Biochem. 37, 409 (1970).
- STRALFORS, A.: Investigations into the bacterial chemistry of dental plaques. Odont. Tidskr. 58, 153 (1950).
- STREHLER, B.L. and TOTTER, J.R.: Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. I. Substrate and enzyme determination. Arch. Biochem. Biophys. 40, 28 (1952).
- STRUGGER, S.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jenaische Z. Naturwiss. 73, 97 (1940).
- TAL, E., DIKSTEIN, S. and SULMAN, F.G.: ATP determination with the Tricarb scintillation counter. Experientia 20, 652 (1964).
- THEILADE, E., WRIGHT, W.H., JENSEN, S.B. and LÖE, H.: Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. J. Periodont. Res. 1, 1 (1966).
- THORE, A., ANSEHN, S., LUNDIN, A. and BERGMAN, S.: Detection of

- bacteriuria by luciferase assay of adenosine triphosphate. J. Clin. Microbiol. 1, 1 (1975).
- TIFFT, E.C. and SPIEGEL, S.J.: Use of adenosine triphosphate assay in disinfection control. Envir. Sci. and Technol. 10, 1268 (1976).
- TRAPP, L.D., NOBLE, W.H., NAVARRO, R. and GREEN, E.: Objective quantification method for measuring in vivo accumulated dental plaque. J. dent. Res. 54, 164 (1975).
- TURNER, N.C. and MEYER, J.Y.: Résultats comparés de tests sur la salive parotidienne, sur la salive mixte et sur la salive mixte sans salive parotidienne. Cahiers Odonto-Stomatolog. 2, 19 (1952).
- VON DER FEHR, F.R., LÖE, H. and THEILADE, E.: Experimental caries in man. Caries Res. 4, 131 (1970).
- WARBURG, O. und CHRISTIAN, W.: Isolierung und Kristallisation des Proteins des oxydierenden Gärungsferments. Biochem. Z. 303, 40 (1939).
- WELSCH, F. and SMITH, L.: Kinetics of synthesis and utilization of adenosine triphosphate by intact cells of Rhodospirillum rubrum. Biochemistry Vol. 8, 8, 3403 (1969).
- WETTERMARK, G. and STYMNE, H.: Substrate analyses in single cells. I. Determination of ATP. Analyt. Biochem. 63, 293 (1975).
- WHITE, E.H., MC CAPRA, F., FIELD, G.F. and MC ELROY, W.D.: The structure and synthesis of firefly luciferin. J. Am. Chem. Soc. 83, 2402 (1961).

Lebenslauf

Am 26. August 1955 wurde ich als Sohn des Technischen Angestellten Hermann Maurer und seiner Ehefrau Helga, geborene Wening, in Fürth geboren.

Nach 4-jährigem Grundschulbesuch trat ich 1965 in das Hardenberg-Gymnasium in Fürth ein und legte dort am 22. Juni 1974 die Reifeprüfung ab.

Vom 1. Juli 1974 bis 30. September 1975 leistete ich meinen Wehrdienst in Ulm und Landsberg/Lech ab.

Zum Wintersemester 1975/76 begann ich an der Universität Erlangen-Nürnberg das Studium der Zahnmedizin und bestand am 6.4.1978 die zahnärztliche Vorprüfung. Am 12. Dezember 1980 beendete ich mein Studium mit dem zahnärztlichen Staatsexamen.

Copy - Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197